

No foreign application

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-71600

(43)公開日 平成9年(1997)3月18日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/745			C 07 K 14/745	
A 61 K 38/55	A C B		C 07 H 21/04	B
C 07 H 21/04			C 12 N 1/21	
C 12 N 1/21			C 12 P 21/02	C
5/10			A 61 K 37/64	A C B

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-228694

(22)出願日 平成7年(1995)9月6日

(71)出願人 000000217  
エーザイ株式会社  
東京都文京区小石川4丁目6番10号  
(72)発明者 水井佳治  
茨城県つくば市松代4-9-10 D-202  
(72)発明者 吉武新次  
茨城県つくば市吾妻3-19-1 1-503  
(72)発明者 加藤弘之  
茨城県北相馬郡守谷町御所ヶ丘5-25-41

(54)【発明の名称】ヒトアンチトロンビンIII 変異体

(57)【要約】

【課題】ヘパリン非存在下で高い抗凝固活性を有する、  
新規なヒトアンチトロンビンIII (AT III) 変異体を  
提供することにある。

【解決手段】AT III をコードするDNAを鋳型として、  
遺伝子組換え法によりATIIIのC末端にチロシンを含む  
オリゴペプチドを付加することにより、またはATIIIC  
末端にオリゴペプチドを付加したAT III変異体のAT III  
反応部位アミノ酸の置換を組み合わせることにより、目的  
とするAT III変異体を得た。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒトアンチトロンビンIII(AT III)のC末端に硫酸化修飾を受けるチロシンを含むペプチドを付加したAT III変異体。

【請求項2】AT IIIのC末端に配列番号1、2または3に記載のペプチドを付加した蛋白質の全部または一部を含むものからなる請求項1記載のAT III変異体。

【請求項3】AT IIIのアミノ酸配列の1もしくは複数のアミノ酸が、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含むものからなる、請求項1に記載のAT III変異体。

【請求項4】AT IIIアミノ酸配列の391位アラニンをグルタミン酸またはアスパラギン酸に置換させた、請求項3に記載のAT III変異体。

【請求項5】AT IIIアミノ酸配列の391位アラニンをロイシンに、392位グリシンをスレオニンに置換させた、請求項3に記載のAT III変異体。

【請求項6】請求項1ないし5に記載のAT III変異体をコードするDNA。

【請求項7】請求項6に記載のDNAを含有するベクター。

【請求項8】請求項7に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項9】形質転換体が大腸菌または動物細胞である、請求項8に記載の形質転換体。

【請求項10】請求項8に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収することを含む、請求項1ないし5に記載のAT III変異体の製造方法。

【請求項11】請求項1ないし5に記載のAT III変異体を有効成分とする医薬組成物。

【請求項12】請求項1ないし5に記載のAT III変異体を有効成分とする血栓性疾患用医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】遺伝子組換え法を用いてヒトアンチトロンビンIIIのC末端にオリゴペプチドを付加すること、更には反応部位のアミノ酸の変異と組み合わせることにより、ヘパリン非存在下で高い抗凝固活性を有するAT III変異体を提供するもので血栓性疾患の治療薬として利用される。

## 【0002】

【従来の技術】ヘパリンをはじめとするグリコサミノグリカンの有する血液凝固阻害活性は、血中のアンチトロンビンIII(AT III)およびヘパリンコファクターII(HC II)により媒介される。AT IIIおよびHC IIは、いわゆるセルピンと総称されるセリンプロテアーゼインヒビターである。これらのうちAT IIIは先天的あるいは後天的な理由による血中活性レベルの低下により血栓症が発症するという報告が多く、一連のセリンプロテアーゼにより構成される血液凝固系の調節因子として生理的に重要

な役割を担っている。ヒトAT IIIはトロンビンおよびXa因子をはじめとする主として凝固系に携わるセリンプロテアーゼを阻害することが知られている。ヒトAT IIIの一次構造はアミノ酸配列の直接決定 (Petersen, T. E. et al., In The Physiologocal Inhibitors of Blood Coagulation and Fibrinolysis, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 43, 1979) ならびにcDNAのクローニング (Bock, S. C. et al., Nucl. Acid Res., 10, 8113, 1982; Prochownik, E. V. et al., J. Biol. Chem., 258, 8389, 1982; Chandra, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1845, 1983) により明らかにされている。これらの報告によると、ヒトAT IIIは前駆体蛋白質より32残基のシグナルペプチドが切断除去されて分泌生成される、432アミノ酸からなる一本鎖糖蛋白である。分子内にN結合性の糖鎖付加を受ける部位を4カ所含んでおり、分子量の約15%は糖である。AT I IIはトロンビンなどのセリンプロテアーゼと1:1で反応し、安定な複合体を形成することにより、これらのプロテアーゼ活性を阻害する (Rosenberg, R. D. & Damus, P. S., J. Biol. Chem., 248, 6490, 1973; Owen, W. G., Biochim. Biophys. Acta, 405, 380, 1975)。この際AT III分子中の393番目のArg残基と394番目のSer残基の間のペプチド結合がプロテアーゼにより切断され、この結果、新たに生じた末端のArg残基とプロテアーゼの活性中心のSer残基との間にアシル結合が生じると考えられている。一般的に、このArg(393)-Ser(394)領域を反応部位と呼ぶ。反応部位近傍のアミノ酸配列はプロテアーゼインヒビターとしての機能発現に重要な役割を担っているとともに、各種プロテアーゼにたいする阻害活性および、特異性を決定する上でも重要であることが多くの報告により明らかとなっている。AT IIIによるプロテアーゼの阻害反応は比較的穏やかに進行するが、反応系にヘパリンが存在すると、その反応速度は劇的に加速され、AT IIIによるトロンビンの阻害速度はヘパリンの添加により1000倍以上となる。この反応加速の作用機構はヘパリンがAT IIIの特定部位(ヘパリン結合部位)に結合することにより、AT IIIの高次構造に変化をもたらしプロテアーゼ・ヘパリン・AT III 3者複合体を形成しやすくなることによると考えられている。また、生理的には血管内皮細胞表面に存在するヘパリン様物質が、同様の作用を現すことによりAT IIIの活性を制御し、血液凝固系の調節に重要な役割を担っていると考えられている。

【0003】種々の原因により引き起こされる血栓症の予防、治療にはいわゆる抗凝固薬が使用されており、ヘパリンは現在でも極めて重要な抗凝固薬の一つである。しかしへパリンの使用により時に重篤な副作用が生じることが報告されている (Amerena, J. et al., Adverse Drug React. Acute. Poisoning Rev., 9, 1, 1990; Levine, M. N. et al., Semi. in Thrombos. Hemostas., 1

2, 39, 1986; Kelton, J. G. et al., ibid, 12, 59, 1986; Levine, M. N., ibid, 12, 63, 1986)。代表的なものとして出血、血小板減少症、副腎機能障害、過敏症、投与部位の壊死、骨粗鬆症等があげられる。このため産婦人科領域あるいは外科手術後など出血の危険性が高い場合、あるいは長期にわたる投与においてはその使用は慎重に行われるべきである。またヘパリンの抗凝固作用はあくまでもAT IIIを介したものであり、血中のAT III濃度が低下しているような病態ではその効果は期待されない。最近、開発されている低分子ヘパリン、ヘパリノイドにおいては諸問題のうちのいくつかは解決されてはいるが、その作用がAT III依存性である点では問題は未解決のままである。一方、ヒトAT IIIは血漿由来の濃縮製剤という形で、先天的なAT III欠乏に基づく血栓形成傾向、およびAT III低下を伴う汎発性血管内皮凝固症候群(DIC)において臨床的に用いられている。しかし、先に述べたように、ヘパリン非存在下におけるAT IIIの抗凝固活性は漸進的なもので、単独の使用は補充療法的な意味合いが強く、抗凝固剤としての有用性は限定される。これまでAT IIIのアミノ酸を変換することによりAT IIIの改良が試みられている。例えばZettlemeyerらはAT III中の糖鎖付加部位のアミノ酸を変換することによって、ヘパリン結合/ヘパリン活性化の性質を向上させるAT III変異体、および反応部位のアミノ酸を変化することにより酵素特異性を変化させたAT III変異体の製造法を開示している(特開平2-26259)。またDijkemaらは反応部位のアミノ酸を変換することによって抗トロンビン/抗Xa活性の変化したAT III変異体の製造法を示している(EP90/01026)。さらに、反応部位あるいは反応部位とヘパリン結合部位を変換することにより、ヘパリン非存在下での抗トロンビン活性を上昇させたAT III変異体が開示されている(特開平5-339292)。しかし、ヘパリンを不要とする更に強い抗凝固活性を持つAT III変異体が望まれている。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明はヘパリン非存在下でも強い抗凝固活性を有する新規なAT III変異体を提供することにある。さらに遺伝子組換え法による大量製造法をも提供することにある。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】ヘパリン非存在下において強いプロテアーゼ阻害活性を有するAT IIIを発明するにはAT IIIがヘパリンと結合した状態をヘパリン非存在下でAT III分子に実現すれば良い。この目的はAT III分子内の構造を変換することにより一部達成された(特開平5-339292)。我々はさらに、AT III分子内にプロテアーゼとの親和性を増強させる構造を付加することにより目的を達成できると考え、種々の新規なAT III変異体を作製し鋭意研究を進めた結果、AT IIIのC末端

に血小板糖タンパク質 GPIb(Dong, J. F., et al., Biochemistry, 33, 13946, 1994; Marchese, P., et al., J. Biol. Chem., 270, 9571, 1995)由来の硫酸化修飾を受けるチロシンを含むペプチドを導入した新規なAT III変異体は、ヘパリン非存在下における抗凝固活性が著しく上昇することを発見した。同時にこの活性上昇の本質は付加ペプチド鎖内におけるチロシン残基の特異的硫酸化に起因することを発見し、本発明をさらに発展させた結果、強い抗凝固活性を有する一連の新規AT III変異体の作製に成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】本発明は変異させたヒトアンチトロンビンIII(AT III)であって、AT IIIのC末端に硫酸修飾を受けるチロシンを含むペプチドを付加したAT III変異体に関する。チロシン含有ペプチドとは、チロシンの前後に位置するアミノ酸5個以内の中に、チロシンの前後それぞれに少なくとも1個の酸性アミノ酸(AspまたはGlu)を有し、合計少なくとも3個の酸性アミノ酸を保有しているペプチドを意味する。付加するペプチドとしては例えば、配列番号1、2または3に記載されるペプチドである。これらペプチドのチロシンを含むその一部を用いてもよく、これらペプチドを含むペプチドを用いることもできるが、チロシン硫酸化に必須な共通配列を乱すものであってはならない(Wielando, B. H. Ann. Rev. Physiol. 50, 363, 1988)。これらペプチドを付加したAT III変異体はさらにAT III部位の1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸の全部または一部を含むものも本発明に含まれる。具体的には例えば、AT IIIアミノ酸配列の391位のアラニンをグルタミン酸またはアスパラギン酸に置換したもの、または391位アラニンをロイシンに、さらに392位グリシンをスレオニンに置換したものなどが挙げられる。さらに本発明はこれらAT III変異体をコードするDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体を用いるAT III変異体の製造方法およびAT III変異体を有効成分とする医薬組成物、に関する。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

##### (1) ヒトAT III cDNAの単離

ヒトAT IIIは主に肝臓において合成されるので、市販のヒト肝臓cDNAライブラリー(λgt 11、クロントク社)を用いればよい。クローニングする方法は公知の方法、例えばAT IIIアミノ酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いるブラークハイブリダイゼーション法(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)等が挙げられる。得られたクローンは必要に応じて、例えばM13mp18などのプラスミドにサブクローニングすることができる。このようにして得られたcDNAの塩基配列は市販のキットを用いたジデオキシ法(Tabor, S. and Rich

ardson, C. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4767, 1987) 等によって決定することができる。得られたAT III cDNA のコーディング領域の塩基配列とそれに基づいて演繹されたアミノ酸配列は特開平5-339292に示される。

#### 【0008】(2) 部位特異的変異導入法

変異導入法は、例えばZollerらの方法 (Zoller, M. and Smith, M., Method in Enzymology, 100, 468, 1983) 、Kramerらの方法 (Kramer, W. and Fritz, H-J., Method in Enzymology, 154, 350, 1987) Vandeyarらの報告 (Vandeyar, M.A. et al., Gene, 65, 129, 1988) などがあげられる。Kramerらの方法は gapped duplex法と呼ばれるもので、M13 ファージのアンバー変異体 M13tv18、M13tv19などをベクターとして用いることができる。これらのベクターにATIIIをコードするDNAをクローニングし、この一本鎖DNAとアンバー変異の入っていないM13 の二本鎖DNAの断片 (M13mpPをPvu IIにて切断して得たベクター断片) とを変性後アニーリングさせ gapped duplex DNAを得る。次にこのDNAに導入したい変異を含む合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼを作用させることによってギャップを埋めた後、大腸菌の mutS 株 (BMH71-18mutS) にトランスフェクションし、sup 0 の大腸菌でのみ増殖できるノンアンバーファージを選択することにより目的とする変異が導入されたファージを効率よく得ることができる。実際の操作には市販のキットを用いてもよい (TAKARA ; Mutan-G)。一方、Vandeyar らの方法はAT IIIをコードするDNAをクローニングしたM13 の一本鎖DNAに、導入したい変異を含むオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせる。これを鋳型とし dATP、dGTP、dTTP、および5-methyl-dCTP を基質としてT7 DNAポリメラーゼを作用させ二本鎖DNAを合成した後、T4 DNAリガーゼを用いて閉環状の二本鎖DNAとする。次にこの二本鎖を制限酵素Msp IとHha Iで処理したのち、エキソヌクレアーゼIIIにて処理することにより変異が導入された鎖のみからなる環状一本鎖DNAを得る。これをメチル化DNAに特異的な制限システムを持たない大腸菌 (SDM 株) に導入することにより目的とするクローナーを効率よく得る。こちらの方法でも実際の操作には市販のキットを用いてもよい (United States Biochemical Corporation ; T7-GEN In Vitro Mutagenesis Kit)。AT III C末端へのアミノ酸の導入は例えば付加するアミノ酸に対応するオリゴヌクレオチドとその相補鎖を合成して5'端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化後、アニーリングし、あらかじめ変異を導入して制限酵素部位Sma Iを導入しておいたAT III cDNAの3'端に連結することにより作製する。導入したい変異を含む合成

オリゴヌクレオチドはDNA合成機 (ABI 社 380A) を用いてフォスフォアミダイト法にて合成することができる。

【0009】(3) AT III cDNA 変異導入用鋳型の調製上記 (1) で得たAT III cDNA のコーディング領域の前後に制限酵素切断部位を導入し変異導入のための鋳型を調製する。制限酵素としては公知のものから適宜選択すればよく、本発明の場合はAT IIIコーディング領域の直前に Hind III 切断部位、直後に Bgl II 切断部位を導入した。まず、上記 (1) で得たAT IIIcDNA を含むプラスミドを EcoR I にて切断しAT III全コーディング領域を含む1.5Kbの断片を得る。この断片をファージM13tv18 のRF (Replicative Form、二本鎖DNA) をEcoR Iにて切断し開環したものに導入する。こうして得られたクローンのうちAT IIIのセンス鎖を含む一本鎖DNAを鋳型として Kramer らの方法に従い、Hind IIIおよびBgl I I の酵素切断部位をそれぞれ含む2種の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、制限酵素切断部位をAT II cDNA のコーディング領域の前後に導入する。次いで、このようにして得られたクローンからAT III cDNA 配列を含む断片を適切なプラスミドに挿入し、変異導入のための鋳型を調製する。本発明の場合は、前記クローンを Hind III および EcoR I にて切断して得た AT III 全コーディング配列を含むDNA断片を同酵素にて切断したプラスミドM13mp19 あるいはpUC19に挿入することにより、変異導入の鋳型を調製することができる。

#### 【0010】(4) 目的とする位置への変異導入

AT III アミノ酸配列において、変換させたい位置のアミノ酸を目的とする他のアミノ酸 (以下、目的アミノ酸と称す) に変換させるには、前記の公知の方法に従い目的アミノ酸をコードするDNAを含む合成オリゴヌクレオチドと (3) に記載した適当なプラスミドを鋳型として用いることにより実施することができる。例えば、AT II C末端に目的アミノ酸を付加させる時は、あらかじめ、表1記載の AT 3-162 合成オリゴヌクレオチドで Sma I 制限酵素部位を導入した後、表1記載の AT 3-170、AT 3-171、AT 3-172、AT 3-173 オリゴヌクレオチドの5'端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化後、アニーリングし、あらかじめ変異を導入して制限酵素部位Sma Iを導入しておいたAT III cDNAの3'端のSma I 部位に連結することにより作製する。本発明において使用したAT III変異導入用合成オリゴヌクレオチドの代表例を表1に、アミノ酸変換部位と目的アミノ酸を表2に記載した。目的アミノ酸をコードする塩基コドンは表1記載のコドンに限定されるものではなく、目的アミノ酸をコードするコドンであれば、いずれも使用できる。

【表1】

## AT III 変異導入用合成オリゴスクレオチドの塩基配列、変換アミノ酸およびその位置

合成オリゴスクレオチド名	塩基配列	(アミノ酸番号)
<u>部位特異的変異導入用合成オリゴスクレオチド</u>		
AT 3 - 5 R	5' GGGGTTTAGCGACCGCGAAAAATCACAAACAGC	3' (A391→F, G392→P) (L125→Q)
AT 3 - 1 G	5' CGGCAGTCAGTTGGCCAAAAGAAGAAG	3' (A391→E)
AT 3 - A391D	5' GTTTAGCGAACGGCCTCAATCACAAACAGCGGT	3' (A391→D)
AT 3 - LT	5' GGGGTTAGCGAACGGGTCAAATCACAAACAGCGGT	3' (A391→L, G392→T) (Sma I site導入)
AT 3 - 162	5' TTATTACTTAACCCCGGGTTGGCTACTCTGCC	3' (Hpa I site導入)
AT 3 - 204	5' AATAAGATCTTATTAGTTAACACAAGGGTTGGC	3' (Hpa I site導入)

オリゴペプチド付加用合成オリゴスクレオチド

AT 3 - 170	5' TGIGTTAACGGTGATGAAGGTGATACTGATCTG	3'
AT 3 - 171	5' TATGATTACTATCCTGAGGAAGATACCGAGTAA	3'
AT 3 - 172	5' ATCATACAGATCAGTATCACCTTCATCACCTTAACACA	3'
AT 3 - 173	5' GATCTTATTACTCGGTATCTCCTCAGGATAGTA	3'
AT 3 - 206A	5' AAGGAAGATTTGACATTTATGACGAGGATGAGAACTAATAA	3'
AT 3 - 206B	5' GATCTTATTAGTTCTCATCCTCGTCATAATGTCAAAATCTTCCTT	3'
AT 3 - 207A	5' AAGAACACTGGGATTATTACGAGGATTCCTATGAGGATTAATAA	3'
AT 3 - 207B	5' GATCTTATTAACTCTCATACGAATCTCGTAATAATCCCCAGTGTCTT	3'

173 変異体変異導入用合成オリゴスクレオチド

AT 3 - 195	5' GTAATCATACAGATCAGTCTAACACACAGGGTTGGC	3' (del. 433~437)
AT 3 - 196	5' CTCAGGATAGTAATCATACTAACACACAGGGTTGGC	3' (del. 433~440)
AT 3 - 197	5' AAGAATAAGATCTTATTAAAGGATAGTAATCATACA	3' (del. 433~440)
AT 3 - 198	5' AAGAATAAGATCTTATTAAATCATAACAGATCAGTAT	3' (del. 446~450)
AT 3 - 301	5' AATAAGATCTTATTATTTATCACCCCTCGGTATCTCCTCAGG	3' (450~452 GDK 付加)
AT 3 - 173YF	5' ATCTTCCTCAGGAAAGAAATCAAACAGATCAGTATC	3' (Y441→F, Y443→F, Y444→F)

【表2】

## AT III C末端への付加配列

	430 432 a.a.
native AT III	- C V K *
AT 3 - 173	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y P E E D T E *
- 195	- C V K T D L Y D Y Y P E E D T E *
- 196	- C V K Y D Y Y P E E D T E *
- 197	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y P *
- 198	- C V K G D E G D T D L Y D *
- 173 Y	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y Y P E E D T E *
- 173 D Y	- C V K G D E G D T D L Y D Y P E E D T E *
- 301	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y P E E D T E G D K *
- 173 Y F	- C V K G D E G D T D L F D F P E E D T E *
- 206	- C V K E D F D I Y D E D E N *
- 207	- C V K N T G D Y Y E D S Y E D *

## AT 3-173に反応部位の変異をさらに導入する

	Reactive site	C末端
	393/394	432
native AT III	- I A G R/S L N -	- C V K *
AT 3 - 173	- I A G R/S L N -	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y P E E D T E *
- 173 E	- I E G R/S L N -	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y P E E D T E *
- 173 D	- I D G R/S L N -	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y P E E D T E *
- 173 L T	- I L T R/S L N -	- C V K G D E G D T D L Y D Y Y P E E D T E *

## 【0011】(5) AT III 変異体組換え発現ベクターとその形質転換体

上記の方法で得られたAT III変異体をコードするDNAは適切なベクターに組み込み、該ベクターを適切な宿主細胞に移入することにより形質転換体を得ることができる。これを常法により培養し、培養物よりAT III変異体を大量に生産することができる。さらに、具体的にはヒトAT III変異体をコードするDNAをAT III変異体の発現に適したベクターのプロモーター下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いる公知の方法により再結合して組換え発現ベクターを作製することができる。ベクターは宿主内で複製、增幅可能であれば特に限定されない。プロモーターおよびターミネーターに関してもAT III変異体をコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定されず、宿主に応じて適切な組み合わせも可能である。このようにして得られた組換え発現ベクターはコンピテントセル法(Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166, 557, 1983)、リン酸カルシウム法(Wigler, M. et al., Cell, 11, 222, 1977)などにより宿主に導入し、形質転換体が作製される。宿主としては大腸菌および動物細胞などが用いられ、得られた形質転換体はその宿主に応じた適切な培地中で培養される。培養は通常20°C~45°C、pH 5~8の範囲で行われる。培養物からのAT III変異体の分離、精製法を適宜組み合わせて実施すればよい。これらの公知の方法としては塩析、溶媒沈殿法、透析、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィーなど

が挙げられる。このAT III変異体は経口的、局所的、静注的、もしくは筋注的皮下注的などにより投与することができるが、局所もしくは静注投与が好ましい。投与量は0.1~100mg/kg、好ましくは0.5~20mg/kgであり、体重に応じて1~50mlの生理食塩液に溶解して用いる。また製剤の形としては、水和剤、水溶剤、錠剤、カプセル剤、粉剤、座剤などが使用でき、これら製剤の担体としては薬学的に許容される賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、分散剤など通常の医薬品に使用されているものが用いられる。

## 【0012】

## 【発明の効果】

## (1) AT III変異体の活性化部分トロンボプラスチック時間(APTT)

ヒト健常人(ボランティア)より採血した血液をクエン酸ナトリウム(最終濃度0.38%)と混和し、10~15分の遠心分離後、血漿を得た。凝固時間はKC10A(エム・シー・メディカル社)装置で各サンプルに関して二重に測定した。要約すると、血漿100μlを装置内のキュベットに直接加え、セフォテスト試薬(エーザイ)100μlを加えた後、6分間インキュベートした。インキュベート後0.02M塩化カルシウム溶液100μlを加え、凝固時間を測定した。図1に各変異体のAPTT延長活性を示した。本発明のAT III変異体は、AT IIIに比べ20~100倍のAPTT延長活性を有することが明らかになった。

## 【0013】(2) 抗Xa活性

テストチームへパリンキット(第一化学薬品)を利用して、本発明のAT III変異体の抗Xa活性を測定した。

すなわち、Xaの合成基質（S-2222）を用いて、Xaに対する阻害活性をヘパリンの非存在下において測定した。対照としては ATIII（アンスロビンP；ヘキストジャパン社）を用いた。本測定において、緩衝液として 0.1% ウシ血清アルブミンおよび 0.15M 塩化ナトリウム含有 50mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）を用い、種々の濃度に調製した検体と一定量のXa（ウシ由来）を 37 °Cで 5 分間反応させた。反応後、合成基質 S-2222 を添加し 2 分間に遊離してくる p-ニトロアニリン量を波長 405nm の吸光度変化で測定することにより、残存する Xa 活性を求めた。この条件下、Xaの活性を50% 阻害する AT III 変異体の濃度（以下 IC50）を算出した。表 3 に各変異体の IC50 値を示した。活性測定に用いた検体はモノクローナル抗体カラムで精製したもの用いた。また\*印で示した検体はゲル濾過によりさらに純度を高めた検体である。ヘパリン非存在下におけるヒトAT IIIの IC50 値は94.8nMであった。これに対し、本発明の AT III 変異体の IC50 値は2.4nM から38.8nMであり明らかに低い値を示し、ヘパリン非存在下の抗 Xa 活性の上昇が認められた。

【表 3】

## AT III 変異体の抗Xa 活性

検体名	抗Xa 活性 IC50 × 10 <sup>-9</sup> (M)
AT III	94.8
AT 3 - 173	4.7
- 173*	3.3
- 195	13.1
- 196	38.8
- 197	7.0
- 198	33.1
- 173Y	5.2
- 173DY	5.8
- 301	4.3
- 173E	4.3
- 173E*	2.8
- 173D	3.0
- 173D*	2.4
- 173LT	13.6
- 173LT*	8.8
- 173/5R	23.6

## AT III 変異体の抗血栓作用

検体名	投与量	閉塞時間 (分) (Mean ± SD)	例数
生理食塩液		21.4 ± 2.7	11
AT III	8mg/kg	29.1 ± 8.0	9
	16mg/kg	36.4 ± 11.6	8
	32mg/kg	46.6 ± 14.3	8
AT 3 - 173	4mg/kg	38.5 ± 11.5	6
	8mg/kg	48.0 ± 13.9	3
AT 3 - 173/5R	4mg/kg	44.7 ± 5.9	6
	8mg/kg	48.3 ± 9.8	3

## 【0014】(3) AT III 変異体の抗血栓作用

血漿由來AT III濃縮製剤（アンスロビンP、ヘキストジャパン社）を対照として、本発明の AT III 変異体の抗血栓作用を以下のように測定した。方法は Peters ら (Peters, R. F. et al., Thromb. Hemostas., 65, 268, 1991) の報告に改良を加えて行った。すなわち、麻酔したSprague-Dawley系雄ラット（200～300g）の頸動脈に生理食塩液を満たしたアトム静脈カテーテル（4Fr, 3.5cm、アトム社）をカニュレーションし、shunt を作製した。血液を遮断した状態で shunt の動脈側に脈波ピックアップ（MPP-3、日本電気）を装着し、血流の変化をポリグラフ記録計で実験中モニターした。計算量の検体材料を 1ml になるように生理食塩液で希釈して同ラットの大腿静脈より単回急速投与した後、shunt を開いて血流を開通させた。shunt を開いてから、shunt 内に血栓が形成されて閉塞するまでの時間を測定し閉塞時間とした。結果は表 4 に示す如く、本発明のAT III 変異体はAT III に比較して強い抗血栓活性を有することが判明した。以上の結果から、本発明の AT III 変異体は血液凝固阻止剤として血栓形成を抑制し、血栓性疾患の予防治療薬として期待される。

【表 4】

【実施例】以下の実施例により本発明を詳細且つ具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0015】実施例1 AT III cDNA 含有プラスミドの作製

プラスミドpSV2-5H3B（特開平5-339292）を Hind III および Sac I にて切断して得た AT III の N 端側をコードする約 730 bp の DNA 断片をやはり Hind III および Sac I にて切断し開環した M13mp19 に導入して mp19-ATNとした。次に pSV2-5H3B を EcoR I および Sac I にて切断して得た AT III の C 端側をコードする約 770 bp の DNA 断片をやはり EcoR I および Sac I にて切断し開環した M13mp19 に導入して mp19-ATC とした。さらに pSV2-5H3B を Hind III 、 Eco RI で切断して得た AT III の全長をコードする約 1.5 kbp の断片を、 Hind III 、 Eco RI で切断して開環した M13mp19 および pUC19 に導入し、それぞれ mp19-5H3B 、 pUC19-5H3B とした。

【0016】実施例2 AT III変異体 DNAの作製

a) AT 3-173、173/5R変異体 DNAの作製

AT III の 391番目の Alaを Phe、392 番目の Glyを Pro で置換した AT III 変異体 AT3-5R をコードする配列を部位特異的変異導入法によって得た。すなわち、実施例 1 で得られた mp19-ATC の一本鎖 DNA を Vandeyar らの方法に従って、合成オリゴヌクレオチド AT 5R (表 1) を作用させることによって目的とするクローン 5R を得た。操作は市販のキット (T7-GEN In Vitro Mutagenesis Kit : USB 社) 添付のマニュアルに従った。初めに 1  $\mu$ g の mp19-ATC 一本鎖 DNA と T4 ポリヌクレオチドキナーゼにて 5' 端をリン酸化した合成オリゴヌクレオチド AT 5R 2pmol を 40mM Tris-HCl (pH7.5) - 20mM MgCl<sub>2</sub> - 50mM NaCl 中 65°C 5 分間加熱後、室温となるまで徐冷した。次にこの反応液 (10  $\mu$ l) に 10 x Synthesis mix ( 100mM Tris-HCl (pH7.5) - 20mM DTT - 5mM dATP - 5mM dGTP - 5mM dTTP - 5mM 5-Methyl-dCTP - 10mM ATP ) を 2  $\mu$ l 、 2.5U の T7DN A ポリメラーゼ、5U の T4リガーゼを加え最終液量 20  $\mu$ l として 37 °C 1 時間反応させた。反応液を 70°C 15 分間加熱して酵素を失活させた後制限酵素 Msp I および Hha I を各 5U 加え 37°C 45 分間反応させた。この操作で Msp I により二本鎖 DNA のうち鑄型としてメチル化されていない DNA 鎖にのみニックが入るとともに二本鎖 DNA に変換されなかつた一本鎖 DNA が Hha I により切断される。次にこの反応液に 50U のエキソヌクレアーゼ III を加え 37 °C 45 分間反応させることによってニックの入った鑄型鎖のみが分解され、結果として変異が導入された DNA 鎖のみが濃縮される。70°C 10 分間加熱し反応を止めた後、メチル化された DNA に特異的な制限システムを持たない (mcrAB) 大腸菌 SDM 株に常法でトランスフェクションした。得られたブラークを数個拾い DNA を得て塩基配列を決定することによって、目的とする変異の導入された

クローン mp19-5R を選択した。さらに、AT III の C 端に Sma I 部位を導入するため、上記の mp19-5R 一本鎖 DNA を鑄型として、上記と同様の方法で行った。用いた合成オリゴヌクレオチド AT 162 は表 1 に示す。目的とする変異の導入されたクローンを mp19-162/5R とした。また、1G の変異の導入は実施例 2 で得られた tv-5H3B を鑄型として Kramer らの方法に従って行った。用いた合成オリゴヌクレオチド AT 1G の配列は表 1 に示す。このクローンより制限酵素 Hind III 、 Bgl II を用いて約 1.4k bp の DNA 断片を切り出し、プラスミド pSV2-dhfr 中のマウス DHFR 遺伝子と入れ替えプラスミド pSV2-1G を得た。次に、得られた mp19-162/5R を制限酵素 Sac I 、 EcoR I で切断し反応部位近傍および C 端に変異を持つ約 730bp の DNA 断片を調製した。また、 pSV2-1G を制限酵素 Hind III 、 Sac I で切断しヘパリン結合部位に変異を持つ、約 670bp の断片を調製した。これら DNA 断片を組み合わせて、 Hind III 、 EcoR I で切断して開環してある pUC19 に導入し、 pUC19-162/1G5R を得た。AT III C 末端への 173 変異の導入は、4種類の合成オリゴヌクレオチド AT 170, 171, 172, 173 (配列は表 1 に示す) をそれぞれ約 1  $\mu$ g 加え、さらに 500mM Tris-HCl (pH8.0) - 100mM MgCl<sub>2</sub> - 100mM 2-mercaptoethanol 5  $\mu$ l 、 10mM ATP 5  $\mu$ l 、 T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 2.5  $\mu$ l を加え最終液量 50  $\mu$ l として、 37°C 1 時間反応させた。反応液を 70 °C 15 分間加熱することにより、反応を止めると同時にアニーリングを行った。この断片を制限酵素 Sma I 、 Bgl II で切断した pUC19-162/1G5R に導入し、 pUC19-173/1G5R を得た。 pUC19-173/1G5R を Hind III 、 Bgl II で切断し、 Hind III 、 Bam HI で切断し開環した哺乳動物の発現ベクター pK4K (特開平5-339292) に導入し pK4K-173/1G5R を得た。173 変異体の作製は、実施例 2 で得た pSV2-5H3B を Hind III 、 Aat I で切断し DNA 断片を調製した。また pK4K-173/1G5R を Aat I 、 Bst YI で切断し DNA 断片を得た。これらの断片を組み合わせ、 Hind III 、 Bam HI で開環した pK4K 、あるいは Hind III 、 Bgl II で開環した pUC19-5H3B に導入し、 pK4K-173 、 pUC19-173 を得た。173/5R 変異体の作製は、実施例 2 で得た pSV2-5H3B を Hind III 、 Eco T22I で切断し DNA 断片を調製した。また pK4K-173/1G5R を Eco T22I 、 Bst YI で切断し DNA 断片を得た。これらの断片を組み合わせ、 Hind III 、 Bam HI で開環した pK4K に導入し、 pK4K-173/5R を得た。

【0017】 b) AT 3-206、207 変異体 DNA の作製

AT III C 末端に変異を導入するための鑄型として、 AT I II C 末端近傍に制限酵素 Hpa I 切断部位を導入した AT3-203 変異体を作製した。すなわち、 mp19-5H3B 一本鎖 DNA を鑄型として、合成オリゴヌクレオチド AT 203 (表 1 に示す) を用いて、実施例 2 a) の方法で行った。得られたクローン mp19-203 を Hind III 、 Bgl II で切断し、 Hind III 、 Bgl II で開環した pUC19-5H3B に導入

し、pUC19-203を得た。206、207変異の導入は実施例2a)に示したように、合成オリゴヌクレオチドAT206A、206BあるいはAT207A、207Bを5'リン酸化後アニーリングし、それぞれをHpaI、BglIIで開環したpUC19-203に導入し、pUC19-206およびpUC19-207を得た。これらを実施例2a)で示した方法によりpK4Kに導入し、pK4K-206、pK4K-207を得た。

【0018】c) AT3-195、196、197、198、173Y、173DY変異体DNAの作製

AT3-195、196、197、198、173Y、173DY変異体DNAは実施例2a)で得られたmp19-173/1G5Rを鋳型として合成オリゴヌクレオチドAT195、196、197、198、173Y、173DY(表1に示す)を用いてVandeyarらの方法で作製し、実施例2a)に示したpUC19-173およびpK4K-173の作製法と同じ方法により作製した。

【0019】d) AT3-173E、173D、173LT変異体DNAの作製

173の変異に反応部位の変化を組み合わせた。173E、173D、173LTの作製はmp19-173を鋳型として、実施例2a)で示したVandeyarらの方法で作製し、それぞれmp19-173E、173D、173LTとした。これらのRF DNAを得てHindIII、BglIIで切断し、DNA断片を得て、HindIII、BamHIで切断して開環したpK4Kに導入し、pK4K-173E、pK4K-173D、pK4K-173LTを得た。

【0020】実施例3 AT III変異体のBHK細胞による発現

BHK細胞(tk-ts13株、Waechter, D. E. and Baserga, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1106, 1982)を $3 \times 10^5$  cells/5ml/25cm<sup>2</sup>培養フラスコに植え込み、翌日、実施例2で得られた173変異体の遺伝子を導入したプラスミドpK4K-173 3μgをCellPfect(Pharmacia社)を使ったリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。培地はダルベッコ変法イーグル培地に牛胎児血清を5%になるように加えて用いた。3日後、細胞をトリプシン処理し、250nM MTXを含む培地で75cm<sup>2</sup>フラスコに継代した。2-3日毎に培養液を交換し、コンフルエントになった時点で175cm<sup>2</sup>フラスコに継代し、再びコンフルエントになった時点で凍結保存して、173変異体発現細胞を得た。実施例2に示したその他の変異体に関して同様にして変異体発現細胞を得た。

【0021】実施例4 変異体発現細胞の培養および変異体の精製

実施例3で得られたAT III変異体発現細胞をローラーボトル(1750cm<sup>2</sup>)にて培養した。培地として5%牛胎児血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地に250nM MTX(終濃度)を加えたものを用いた。300mlの培地に細胞を接種し、37℃で培養し、培養開始より3~4日後より毎日同量の培地で培地交換し培養上清を集めた。AT II変異体の精製は、抗ヒトAT IIIモノクローナル抗体を担体に結合した抗体カラムによるアフィニティクロマト

グラフィーにて行った。すなわち、あらかじめ50mM Tris-HCl(pH7.5)-0.5M NaClにて平衡化した抗体カラムに上記培養上清をチャージし、同上バッファーにて洗浄後、0.2M Glycine-HCl(pH2.5)にて溶出した。溶出画分は直ちに1/2用量の1M Tris-HCl(pH8.0)にて中和した。得られた画分をダルベッコPBS(-)に対して透析後、限外濃縮してその後の実験に供した。一部の変異体については、抗体カラムの溶出画分を限外濃縮後、セファクリルS-200にチャージし、ダルベッコPBS(-)にてゲルろ過した。得られた活性画分を濃縮後その後の実験に供した。なお、培養、精製過程でのAT III変異体の定量は抗AT III抗体を用いたEIA法にて行った。

【0022】実施例5 AT3-173変異体のチロシン硫酸化の確認

AT3-173変異体のチロシン残基に硫酸基が付加するか否かを実施例3で得た、173変異体発現細胞を用いて確認した。チロシン硫酸化の確認方法はAndrewらの方法(Andrew, J. D. et al., Method in enzymology, 185, 577, 1990)で行った。すなわち、173変異体発現細胞および天然型AT III(5H3B)発現細胞をそれぞれ $1 \times 10^5$  cells/wellになるよう24ウェルプレートに植え込む。培地はダルベッコ変法イーグル培地に牛胎児血清を5%になるように加えて用いた。24時間後、培地を除去し、2mlの硫酸イオンを除去したダルベッコ変法イーグル培地(sulfate-free DMEM)で細胞を洗浄し、0.5mlのsulfate-free DMEMを加え、さらに3.7MBq/mlとなるように[<sup>35</sup>S]硫酸塩(アマシャム社)を加えて24時間培養した。培養上清を集め公知の方法(Andrew J. D. et al., Method in enzymology, 185, 577, 1990)にて免疫沈降し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて解析した。

硫酸化のパターンを図2に示した。天然型AT IIIでは硫酸化は起きていないが、AT3-173では硫酸化が起きていることが明らかになった。また、チロシン硫酸化の特異的阻害剤であるNaClO<sub>3</sub>を加えた実験により、AT3-173の硫酸化が阻害されたことから、チロシン残基が硫酸化されていることが証明できた。

【0023】実施例6 AT3-173変異体の硫酸基の抗凝固活性におよぼす影響

AT3-173変異体の441、443、444位のチロシン残基をフェニルアラニンに変換した、AT3-173YFを作製し、抗Xa活性を測定した(表3)。すなわち、mp19-173を鋳型として合成オリゴヌクレオチドAT-173YFを用いて実施例2(a)に示す方法にて変異体DNAを作製し、実施例3および実施例4に示す方法でAT3-173変異蛋白質を得て、発明の効果(1)で示した方法により、抗Xa活性を測定した。硫酸基の付加部位であるチロシン残基をフェニルアラニンに変換したAT3-173の変異体はその抗Xa活性が約1/6になった。AT3-173における硫酸基は強い抗凝固活性を示す上で大変重要であることが明らかになった。

【表5】

## 硫酸基のAT 3-173 の抗Xa 活性における影響

検体	抗Xa 活性 (IC50 : nM)	対AT III 活性比
AT III	94.8	1.00
AT 3 - 173	4.7	20.00
AT 3 - 173YF	27.8	3.41

【0024】

【配列表】

配列番号：1

配列

Gly Asp Glu Gly Asp Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp  
 1 5 10 15  
 Thr Glu Gly Asp Lys  
 20

配列番号：2

配列の長さ：11

配列の型：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn  
 1 5 10

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の長さ：21

配列の型：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp  
 1 5 10

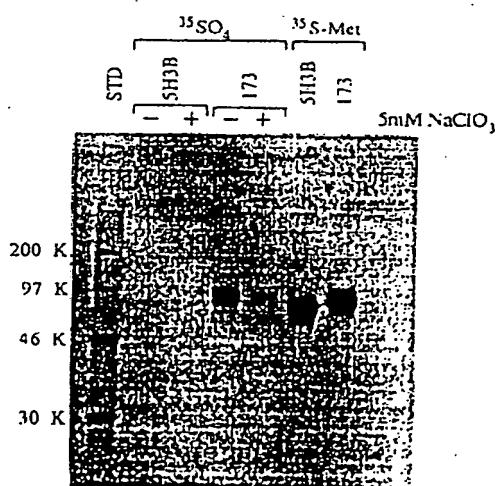
【図面の簡単な説明】

【図1】(A) モノクローナル抗体で精製した検体のAP TTの測定

(B) モノクローナル抗体で精製した検体を更に、ゲルfiltrationし純度を高めた検体のAPTTの測定

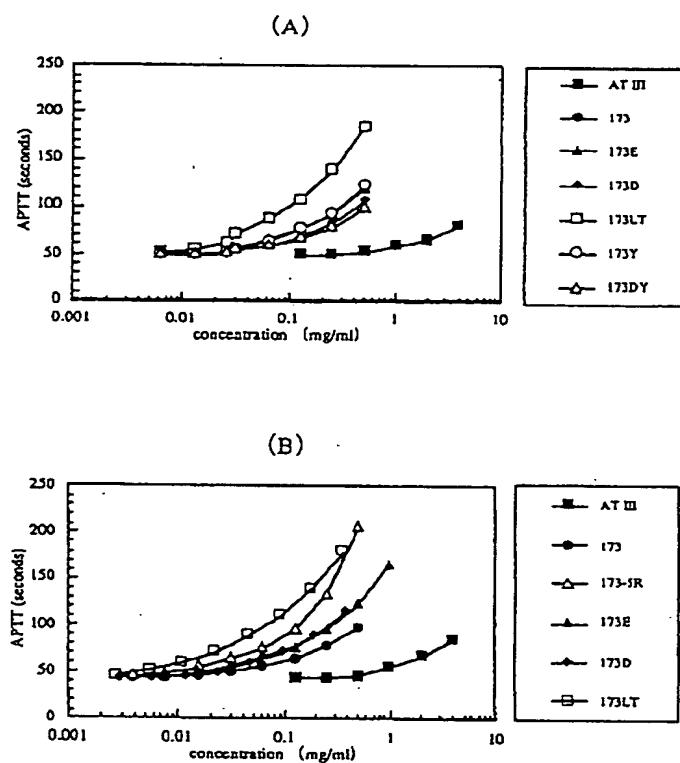
【図2】AT III変異体硫酸化の確認、SDS-PAGE泳動図

【図2】



Autoradiogram of SDS-PAGE

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所  
 C 1 2 N 15/09 Z N A 9162-4B C 1 2 N 5/00 B  
 C 1 2 P 21/02  
 //((C 1 2 N 1:21  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 R 1:91)  
 (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:91)

Z N A A